Aus dem Zentrum für Physiologische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität Düsseldorf
Abteilung für Onkologische Chemie

Direktor: Professor Dr. H. Bojar

INSULINEFFEKT AUF DIE LATERALE DIFFUSION VON LIPIDEN UND PROTEINEN IN DER PLASMAMEMBRAN ISOLIERTER HEPATOZYTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Martin Stuschke

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Zentrum für Physiologische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität Düsseldorf
Abteilung für Onkologische Chemie

Direktor: Professor Dr. H. Bojar

INSULINEFFEKT AUF DIE LATERALE DIFFUSION VON LIPIDEN UND PROTEINEN IN DER PLASMAMEMBRAN ISOLIERTER HEPATOZYTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Martin Stuschke

1984

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Professor Dr. A. Hopf

Referent: Professor Dr. H. Bojar

Korreferent: Professor Dr. Dr. P. Pfitzer

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	Chemikalien und Reagentien	4
2.2	Isolierung der Rattenleberparenchymzellen	4
2.3	Insulininkubation und Fluoreszenzmarkierung der Hepatozytenplasmamembran	5
2.4	Messung lateraler Diffusion in Membranen	8
2.4.1	Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) Messungen	9
2.4.1.1	Optischer Aufbau	9
2.4.1.2	Elektronischer Aufbau	13
2.4.1.3	Ablauf der FRAP Messung und Analyse der Meßkurve	15
2.5	Versuchsplanung und statistische Auswertung	18
3	RESULTATE	20
3.1	Insulineffekt auf den lateralen Diffusionskoeffizienten und die Fluorescence Recovery der Membransonden	20
3.2	Spezifität des Insulineffektes	29
3.3	Zeitabhängigkeit des Insulineffektes	30
3.4	Temperaturabhängigkeit des Insulineffektes	30
3.5	Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten	31
4	DISKUSSION	33
4.1	Membranorganisation und Messungen lateraler Diffusion	33
4.2	Insulineffekt auf die Membrandynamik	35
4.3	Bedeutung der veränderten Lipiddynamik für den Insulinwirkungsmechanismus	37
5	Zusammenfassung	40
6	LITERATURANGABEN	41

1 Einleitung

Das Signal oder die Kette von Signalen, die nach der Bindung von Insulin an Plasmamembran-Rezeptoren erzeugt wird und durch die eine Vielzahl physiologischer Insulineffekte, wie Veränderungen des Substrattransports durch die Plasmamembran oder Beeinflussung intrazellulärer Stoffwechselprozesse, ausgelöst wird, ist noch nicht identifiziert (1,2,3).

Als mögliche Mediatoren der Insulinwirkung werden diskutiert: Peptide oder Glykopeptide, die durch die proteolytische Wirkung des Insulinrezeptor-Komplexes auf Plasmamembranproteine erzeugt werden (3,4,5), Insulinmetabolite oder internalisiertes Insulin selbst, die mit Rezeptoren auf Zellorganellen interagieren(6,7,93), zyklische Nukleotide (2), Veränderungen des transmembranären Ionenstromes oder der intrazellulären Calcium-Konzentration (2), Oxidation einiger Membransulfhydrylgruppen zur Disulfidform (2), Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Membranproteinen einschließlich des Insulinrezeptors(8,91,92) und Veränderungen des Phospholipidumsatzes und Spektrums in der Zelle und Zellmembran (2,8,10,11). An früher Stelle in dem nach der Hormonrezeptorbindung ablaufenden Insulinwirkungsmechanismus wird auch die Bedeutung der Rezeptoraggregation herausgestellt (1).

Viele dieser Veränderungen bewirken eine Modulation der Membranfluidität (10,12), wodurch eine Vielzahl von Membranproteinen in ihrer Funktion verändert werden kann (13).

Der Einfluß von Insulin auf die Dynamik von Plasmamembran-

lipiden verschiedener Zelltypen wurde mit unterschiedlichen Methoden untersucht:

Fluoreszenzpolarisationsmessungen liefern Informationen über die Einschränkung der Rotationsdiffusion der Fluoreszenzsonde durch die molekulare Anordnung von Lipiden und Proteinen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Insulin vergrößerte die Fluoreszenzpolarisation von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), cis-Parinarsäure und trans-Parinarsäure in Membranpräparationen von Rattenleberzellen (14,15) und von DPH in Erythrozyten-Membranpräparationen (16). Dies entspricht einem Viskositätsanstieg in der Zellmembran (17). Mit der gleichen Methode fanden Bailey et al. (18) eine Senkung der Fluoreszenzpolarisation von Anthroyl-Stearat in Fettzell-Membranpräparationen der Ratte.

Durch Messung der Eximerbildungsrate der kleinen hydrophoben Lipidsonde Pyren zeigten Luly et al. (19), daß Insulin die laterale Diffusionsgeschwindigkeit der Probe in Membranpräparationen von Rattenhepatozyten vermindert. In menschlichen Erythrozyten fanden Bryzewska et al. (20) einen Anstieg des lateralen Diffusionskoeffizienten von Pyren nach Insulininkubation.

Elektronenspinresonanzspektren, die Information über thermische Bewegungen in Moleküldimensionen, wie Biegungen in der Hydrocarbonkette markierter Fettsäuren und Oszillation der Fettsäuremoleküle um ihre Längsachse sowie Oszillation der Längsachse selbst, enthalten (21), zeigten keinen Effekt von Insulin auf das dynamische Verhalten von

5-Nitroxidstearansäure in Fettzell-Ghosts oder Membranpräparationen (22,23) oder in Plasmamembranen menschlicher Erythrozyten (24).

Bei Untersuchungen des kooperativen Verhaltens membrangebundener Enzyme wie der Acetylcholinesterase und der $(Na^+ + K^+)$ - ATPase fanden Massa et al. (25) Änderungen des Hill-Koeffizienten dieser Enzyme in Ratten-Erythrozytenmembranen nach Insulinbehandlung, die indirekt auf eine verminderte Membranfluidität schließen lassen.

Die voranstehenden uneinheitlichen Resultate veranlaßten mich, mit einer von den oben genannten Methoden unabhängigen Technik, der Messung der Relaxation einer durch Photobleaching erzeugten inhomogenen Verteilung fluoreszierender Membransonden (FRAP), einen Insulineffekt auf die laterale Diffusion von Lipiden und Proteinen in der Plasmamembran lebender Zellen über Distanzen im µm-Bereich zu erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagentien

Insulin (Monocomponent insulin vom Schwein) und Proinsulin wurden vom Novo Research Institute (Kopenhagen, Dänemark) bezogen, Desoctapeptid insulin wurde von Prof. Dr. Brandenburg (Deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen) zur Verfügung gestellt. Die fluoreszierenden Lipid-Sonden 5-(N-Dodecanoyl) aminofluorescein (F-C12), 5-(N-Hexadecanoyl) aminofluorescein (F-C16), 1,1'- Dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin (diI-C16 (3)) und 1,1' Dioctadecyl - 3,3,3'3'- tetramethylindocarbocyanin (diI-C18 (3)) waren von Molecular Probes, Inc. (Junction City, Oregon); 1-Acyl-2- (N-4-nitrobenzo-2-oxa 1,3-diazolyl)-aminocaproyl phosphatidylcholin (NBD-PC) und N-4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol dioleyl phosphatidyl-äthanolamin (N-NBD-PE) waren von Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Alabama). Fluorescein isothiocyanat wurde von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen, die Pufferlösung nach Hanks war von Gibco, Inc. (Grand Island, New York), das nach Dulbecco modifizierte Minimal Essential Medium Eagle (MEM-D) von der Firma Boehringer (Mannheim, Katalog-Nr. 607797) und Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, war von Miles, Inc. (Maidenhead, England); alle übrigen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2 Isolierung der Rattenleberparenchymzellen

Für die Experimente wurden männliche Albinoratten (Stamm Wistar, Gewicht 200-230 g), die mit Standarddiät, (Firma Altromin) und Wasser nach Belieben ernährt wurden, verwendet.

Die von Bojar et al. (26) angegebene Methode zur enzymatischen Isolierung intakter Leberparenchymzellen wurde unverändert übernommen. Nach dem letzten Waschen wurde das Zellpellet in MEM-D (pH 7.4), das 2,5 % (w,v)BSA enthielt, resuspendiert (10 mg Pellet/ml Medium) und anschließend 30 min lang unter einer Carbogenatmosphäre (95 % O_2, 5 % CO_2) auf einem Dubnoff-Inkubationsschüttler 30 min bei 21°C zur Verbesserung der Zellviabilität während des weiteren Experimentes vorinkubiert (27) und unter diesen Bedingungen bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.3 Insulin Inkubation und Fluoreszenzmarkierung der Hepatozyten-Plasmamembran

400 µl Anteile der Vorratszellsuspension wurden in 1,5 ml Polyäthylen-Zentrifugenröhrchen einmal mit MEM-D, 0,3 % BSA, gewaschen (zentrifugiert für 60 sec. bei 250 Umdrehungen /min., $Rotorradius_{max}$ 6 cm; das überstehende Medium wurde mit einer Pipette abgesaugt und das Pellet resuspendiert) und in 400 µl MEM-D, 0,3 % BSA, das jetzt Insulin oder Insulinanaloge in den angegebenen Konzentrationen enthielt, resuspendiert. Die angegebenen Insulinkonzentrationen sind wegen des Insulinabbaues durch die Hepatozyten als obere Grenzwerte zu betrachten (28). Nach Begasen mit Carbogen wurden die Zellen 25 min lang bei 21°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zur Integration der amphiphilen, fluoreszierenden Lipid-Sonden in die Plasmamembran der Hepatozyten wurden die Zellen nach milder Zentrifugation in 1 ml BSA freiem MEM-D, Insulin

UNIV. LEIDEN BIBL.

oder Analoge wie angegeben, resuspendiert, mit 5 µl der Lipidsonden-Äthonollösung versetzt und unter Schütteln 10 min lang bei 4° C inkubiert. Die Endkonzentration von NBD-PC und F-C12 im Inkubationsansatz war 5 µg/ml, von F-C16 10 µg/ml. Die benötigten Farbstoffkonzentrationen liegen im Bereich der Literaturangaben für Färbungen anderer Zelltypen (29,30). Anschließend wurden die Zellen viermal mit MEM-D, 0,3 % BSA, Insulin wie angegeben, bei 4°C gewaschen.

Zur Markierung von Membranproteinen wurden die Zellen nach der Insulininkubation 10 min lang bei 4°C in Hanks-Pufferlösung inkubiert, die 20 mmol/l HEPES, 0,5 % (v,v) Äthanol, 150 µg/ml FITC, Insulin wie angegeben, enthielt und mit NaOH auf pH 8,3 eingestellt wurde (bei ansteigender H^+-Konzentration (pH < 8,0) zeigten die Zellen eine zunehmend schwächere Ringfluoreszenz). Anschließend wurden die Hepatozyten viermal in BSA freiem MEM-D, Insulin wie angegeben, pH 7,4, gewaschen und in diesem Medium resuspendiert. Die Färbebedingungen wurden so gewählt, daß die Membranfluoreszenz die zelleigene Fluoreszenz bei der angegebenen Wellenlänge ca. 100-fach übersteigt. Hierbei wurde die Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe im Inkubationsbad möglichst gering gehalten. Die Zellen zeigten eine starke Membranfluoreszenz bei nur geringer Zytoplasmafluoreszenz (Abb.5). Insgesamt sind die angegebenen FITC-Färbebedingungen im Vergleich zu den von Edidin et al. (31) für Mäusefibroblasten und von Peters (32) für Erythrozyten angegebenen als mild anzusehen. Bis zur Diffusionsmessung wurden die fluoreszenzmarkierten

Zellen bei 4°C unter Schütteln maximal 35 min gelagert. Für F-C12 markierte Zellen wurden die Diffusionsmessungen wegen der schnelleren Farbstoffinternalisierung bei 8°C durchgeführt. Im Übrigen, falls nicht anders bezeichnet, betrug die Meßtemperatur 21° C. Vor dem Bleichen wurden die Zellen 2 min zur thermischen Equilibration auf Meßtemperatur gehalten.

Unter den angegebenen Bedingungen war während der Fluorescence Recovery Messung (Dauer für Lipid-Sonden markierte Zellen ca. 4 min, für FITC markierte Zellen ca. 13 min) keine störende Zunahme der Zytoplasma-Fluoreszenz zu bemerken. Zur Verhinderung der Farbstoffinternalisierung während der Färbeperiode und der anschließenden Lagerungszeit war aber eine Umgebungstemperatur von 4°C notwendig (siehe auch Struck et al. (33)).

Weiter wurde versucht, die Lipidsonden diI-C16(3), diI-C18 (3) und N-NBD-PE in die Hepatozyten-Zellmembran zu inkorporieren. Dabei wurden die Temperatur (4-21° C), die Fluoreszenzsondenkonzentration (5-100 µg/ml), die BSA-Konzentration (0-4 %) und die Alkoholkonzentration (0,5-10 %) im Inkubationsansatz über einen weiten Bereich, der die bei Wolf et al. (30) angegebenen Bedingungen enthält, variiert. Die Fluoreszenz war unter diesen Bedingungen auf die Zelloberfläche begrenzt (Ringfluoreszenz im Mikroskop bei Fokussierung auf den Zelläquator), aber fein gepunktet. Dies mag durch Lipidsondenaggregate an der Membranoberfläche (30) oder Färbung membrannaher Zellorganellen bedingt sein. Für N-NBD-PE hatten Struck et al. nachgewiesen, daß es im Gegensatz zu NBD-PC nicht an dem Lipidaustausch zwischen

Zellmembran und Lipidvesikeln teilnimmt (33). Die Fluorescence Recovery der drei angeführten Sonden schwankte stark von Zelle zu Zelle bei den FRAP-Messungen im Bereich von 10-60 %. Daher waren die Sonden für die Untersuchung eines Insulineffektes auf die Lipiddiffusion nicht geeignet.

2.4 Messung lateraler Diffusion in Membranen

Zur Messung lateraler Diffusion von Proteinen und Lipiden in Biomembranen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Spektroskopische Methoden, wie die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (21,34), die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie (35,36) und die Bestimmung der Eximerbildungsrate zwischen einem angeregten Farbstoffmolekül und einem Molekül im Grundzustand aus dem Verhältnis Eximer zu Monomer Fluoreszenzintensität (37), stehen zur Verfügung.

Andererseits werden Methoden verwandt, die auf der Relaxationsmessung einer anfänglich inhomogen lateralen Fluoreszenzverteilung in der Membran beruhen. Aus den Meßkurven lassen sich in Abhängigkeit von der Geometrie der anfänglichen Fluoreszenzungleichverteilung die lateralen Diffusionskoeffizienten der Probe berechnen. Die initiale inhomogene Sondenverteilung kann durch Zellfusion (38,39), punktuelles Markieren der Membran (40), Elektrophorese (41) und Fluorescence-Photobleaching (31,42,43,44) erzeugt werden. Weiter können laterale Diffusionskoeffizienten nach dem spiegelbildlichen Prinzip, der Messung der Cap- oder Patchbildung anfänglich gleichverteilter Membranproteine, ausgelöst durch Antikörper-Oberflächenantigen- oder Ligand-

Rezeptor-Bindung, bestimmt werden (45,46).

2.4.1 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) Messungen

Vorteile dieser Methode sind:

a) Messungen von Diffusionskoeffizienten im Bereich 10^{-12} $cm^2/s < D < 10^{-7}$ cm^2/s.
b) Messung lateraler Diffusion in Membranen lebender Zellen.
c) Messung lateraler Diffusion an definierten Stellen der Zellmembran z.B. in Caps oder Patches (47,48).
d) Messung lateraler Diffusion über Distanzen im µm-Bereich.
e) Diffusionsmessung einer Vielzahl markierter Lipide und Proteine ist möglich.
f) Unterscheidung zwischen gerichtetem Fluß und thermischer Bewegung ist möglich.

Die verwendete Meßapparatur beruht auf dem Prinzip des Spot-Photobleaching (Theorie beschrieben bei Axelrod et al. (49)). Der optische Aufbau ist in Grundzügen dem von Koppel et al.(44) skizzierten ähnlich.

2.4.1.1 Optischer Aufbau

Das Schema des verwendeten optischen Systems ist in Abb.1 dargestellt. Laserlicht eines Argon-Ionen-Lasers passiert einen Strahlenteilerspiegel (Reflexionsverhältnis 1 %), das durchgelassene Licht trifft nach variabler Abschwächung durch einen Graufilter ND2 auf einen Relaisverschluß, der den Bleichstrahl für ein einstellbares Zeitintervall von

0,1-1 s freigeben kann. Das reflektierte Licht trifft auf zwei in beiden Raumwinkeln verstellbare Spiegel, die die exakte Superposition von Meß- und Bleichstrahl erlauben. Der Meßstrahl kann ebenfalls variabel durch einen Graufilter ND1 abgeschwächt werden. An der dem Laser abgewandten Seite eines zweiten Teilerspiegels werden dann der Meß- und Bleichstrahl zur Deckung gebracht und durch einen Strahlausrichter, zwei in beiden Raumwinkeln verstellbare Spiegel, in die optische Achse des Mikroskopes ausgerichtet und in dieses eingespiegelt. Die Linse L1 fokussiert den Laserstrahl auf die Lochblende FD1, die sich in der Bildebene des Mikroskopes befindet. L1 und FD1 sind um ihre Position in Strahlrichtung getrennt verschiebbar. Durch den Radius und die Position der Lochblende wird der Bleichfleckradius auf der Zellmembran festgelegt. L1, FD1 und das Mikroskopobjektiv wirken zusammen als Raumfilter, wodurch das Querschnittprofil des Laserstrahles verbessert wird. Über einen dichroischen Spiegel (Reflexionskurzpaßfilter) wird dann das anregende Laerlicht auf das Präparat gelenkt. Abb. 3 zeigt schematisch die Geometrie des fokussierten Laserstrahles auf der Zelloberfläche. Die Zellsuspension wird durch drei Deckgläser, zwei dienen als Abstandshalter, eines als Decke, umrahmt. Hierdurch entstehen keine Strömungen in der umgebenden Zellsuspension bei Relativbewegungen des Objektivs zu den auf den Objektträger sedimentierten Zellen. Das von den Sonden in der Zellmembran entsandte Fluoreszenzlicht passiert dann den Reflexionskurzpaßfilter und einen Lang-

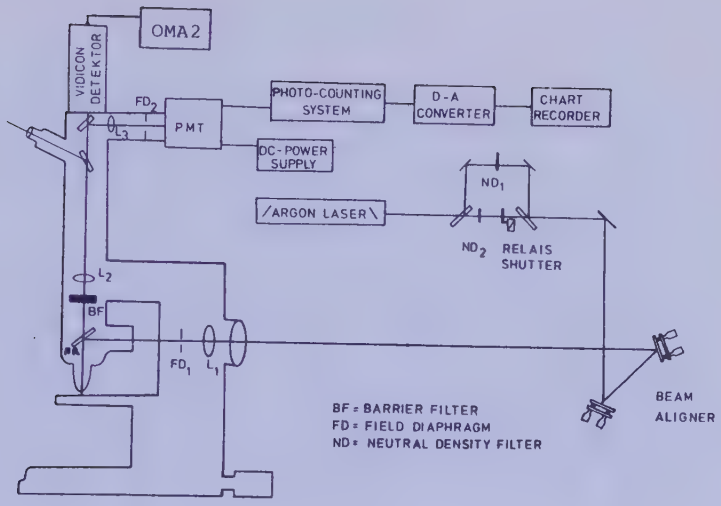

Abb. 1: Schema der Photobleichapparatur

Abb. 2: Laboraufbau der Photobleichapparatur

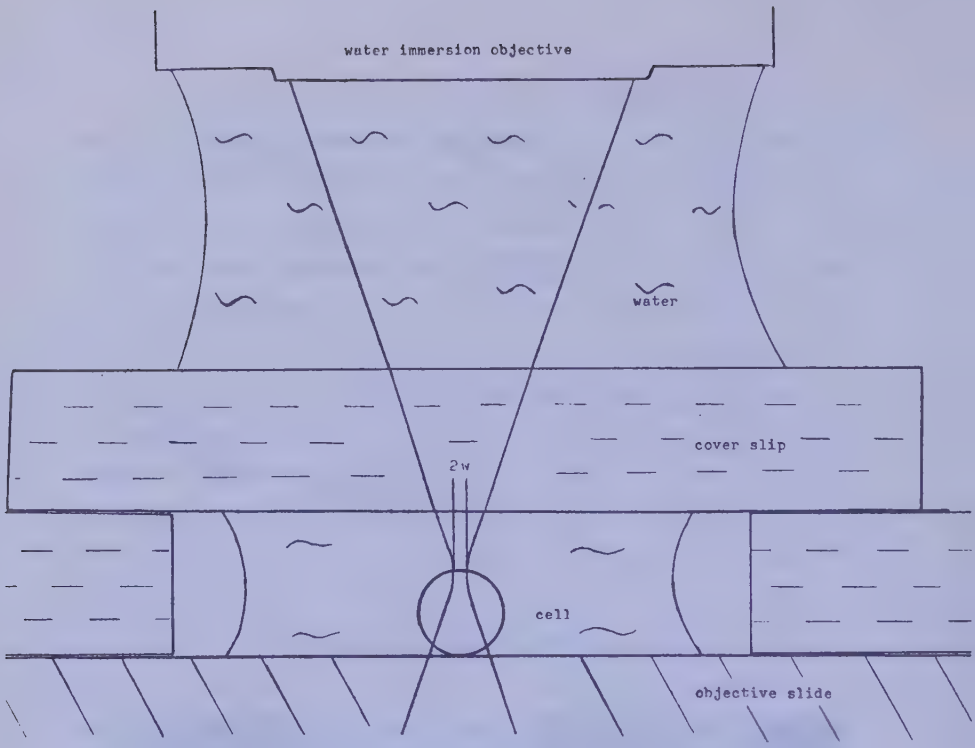

Abb. 3: Schematische Darstellung des auf die Plasmamembran fokussierten Laserstrahles

paßfilter BF und wird dann auf den Vidicondetektor eines optischen Vielkanalanalysators (OMA 2) oder auf einen Photomultiplier abgebildet. Die Blende FD2 in der Bildebene vor dem Photomultiplier bewirkt eine relativ größere Empfindlichkeit des Systems für Fluoreszenzlicht aus der Objektebene gegenüber der Hintergrundfluoreszenz aus anderen Ebenen. Da Lateralverschiebungen des Laserstrahles relativ zum Mikroskop und der Zelloberfläche während der Meßzeit ausgeschlossen sein müssen, ruht die ganze Apparatur auf

einer massiven Granitplatte, die von Bodenschwingungen durch pneumatische Stoßdämpfer abgekoppelt ist. Das verwendete Mikroskop ist ein modifiziertes Leitz-Fluoreszenzmikroskop der Firma BTG, Biotechnik GMBH.

2.4.1.2 Elektronischer Aufbau

Um die Fluoreszenzverteilung in der Objektebene analysieren zu können, wurde ein optischer Vielkanal-Analysator (OMA 2, EG + G Princeton Applied Research, N.J.) an das Mikroskop angekoppelt. In einem variabel definierbaren rechteckigen Fenster innerhalb des Vidicondetektorsichtfeldes kann die Fluoreszenzverteilung quantitativ computerunterstützt analysiert werden. Das auf dem Monitor wiedergegebene Bild (siehe auch Abb.4,5) zeigt auf der horizontalen Achse die Position entlang einer Fensterachse an. Auf der Ordinate wird die über die andere Fensterachse integrierte Fluoreszenzintensität wiedergegeben. Das Intensitätsprofil des Laserstrahles, gemessen über die angeregte Fluoreszenzverteilung in der Plasmamembran eines NBD-PC markierten Hepatozyten, ist in Abb. 4 wiedergegeben. Das verwendete Fenster umfaßt den Laserstrahl in voller Breite. Abb. 5 zeigt das Intensitätsprofil eines 1,5 µm breiten Streifens in der Äquatorialebene der Zelle. Deutlich ist die selektive Membranfärbung an den seitlichen Peaks zu ersehen. Zum Zellmittelpunkt fällt die Fluoreszenzintensität deutlich ab. Das hier gemessene Restsignal kommt hauptsächlich von der Zellmembran ober- und unterhalb der Äquatorebene. Mit seinen 500 Kanälen erlaubt der Vielkanal-

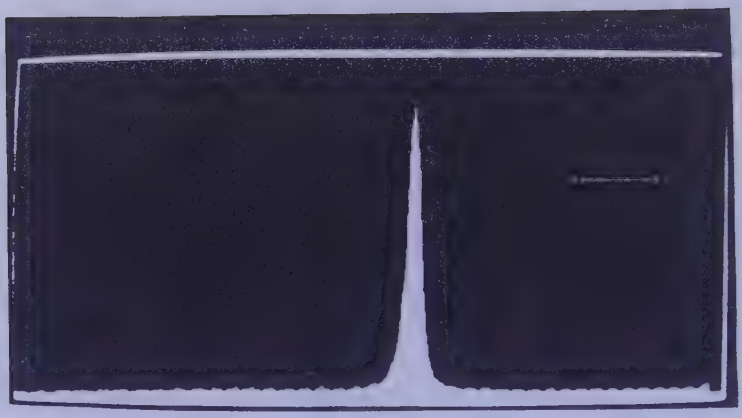

Abb.4: Durch den Meßstrahl angeregte Fluoreszenz auf der Hepatozytenmembran; Balken: 10 um

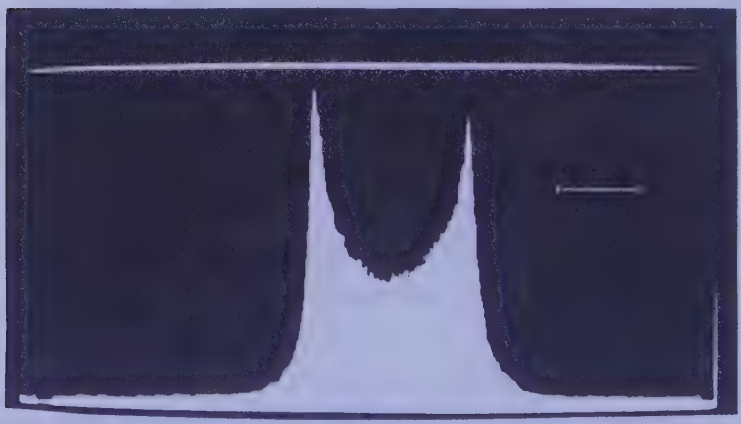

Abb.5: Fluoreszenzverteilung entlang eines 1.5 um breiten Streifens in der Äquatorialebene eines NBD-PC markierten Hepatozyten; Balken: 10 um

analysator eine Auflösung von 0,15 µm in der Objektebene. An das gemessene Intensitätsprofil können mittels des eingebauten PDP 11 Computers Modellfunktionen angepaßt werden.

Zur zeitaufgelösten Messung der Fluoreszenzintensitätsveränderungen in dem durch den Laser beleuchteten Fleck in der Objektebene dient der thermoelektrisch auf - 40°C gekühlte, sehr empfindliche Photomultiplier (RCA, Lancaster, England, Modell C 31034)). Die durch Detektion einzelner Photonen ausgelösten Stromimpulse werden im Photo-Counting-System (EG + G, Bracknell, England, 5C1) während eines einstellbaren Zeitintervalles aufsummiert und über einen DA-Wandler in eine proportionale Spannung umgesetzt, die auf einem x-t-Schreiber registriert wird. Nach Beendigung einer Sammelperiode wird ohne zeitlichen Verlust der Zähler im Photo-Counting-System zurückgesetzt und die nächste Sammelperiode beginnt.

2.4.1.3 Ablauf der FRAP Messung und Analyse der Meßkurve

Für die Diffusionsmessungen von Lipiden und Proteinen in der Hepatozytenmembran wurden die Spezifikationen der Apparatur so eingestellt, daß für jede Fluoreszenzprobe der Bleichgrad B ($B = (F_{(-)} - F_{(o)})/F_{(-)}$; $F_{(-)}$: Fluoreszenzintensität vor dem Photobleaching; $F_{(o)}$: Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Photobleaching; $F_{(\infty)}$ asymptotischer Wert der Intensität nach dem Bleichen , Abb.6) ungefähr 60 % beträgt, die zeitliche Auflösung der Recoverymessung ausreichend ist (Sammelperiodenzeit $< t_{1/2}/10$, $t_{1/2}$:Halbwertszeit der Fluoreszenzrelaxation), das Signal zu

Rauschverhältnis $\geq$ 100 ist und die Bleichzeit möglichst kurz gehalten werden kann, da über einen Anstieg der Häufigkeit photochemischer Reaktionen mit zunehmender Bleichzeit berichtet wurde (50). Die Bleichzeit betrug 0,2-0,3 s, die Leistung des Monitorlaserstrahles $\sim$1-5 µW, das Verhältnis Bleich/Monitor-Laserleistung war $\sim$10000-40000 fach, die Sammelperiodenzeit des Photo-Counting-Systems betrug 0,1-1 s, und der Radius des Bleichfeldes w auf der Zellmembran betrug 2,7 $\pm$ 0,1 µm (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes). Dieser Referenzradius wurde täglich durch Messungen an 10 Zellen (Anpassung einer Gausskurve an die gemessene Intensitätsverteilung (Abb. 5) und Bestimmung des $1/e^2$ Radius) bestimmt.

Für die Messungen wurden nur Zellen mit einem Durchmesser von 24 $\pm$ 2 µm zugelassen.

Bei einem Photobleaching-Experiment wird zum Zeitpunkt 0 ein Teil der Fluoreszenzsonden im beleuchteten Fleck auf der Zellmembran irreversibel gebleicht (Abb. 6). Die durch den Monitorstrahl angeregte Fluoreszenz fällt in ihrer Intensität von $F_{(-)}$ auf $F_{(o)}$ ab. Durch Diffusion ungebleichter Membransonden aus der Umgebung in den Bleichpunkt nimmt das Fluoreszenzsignal bis zu einem Maximalwert F (∞) wieder zu. Die mathematische Beschreibung der Recovery-Kurve ist bei Axelrod et al. (49) dargestellt. Der Diffusionskoeffizient wird nach einem 3-Punkte-Fit an die Meßkurve gewonnen

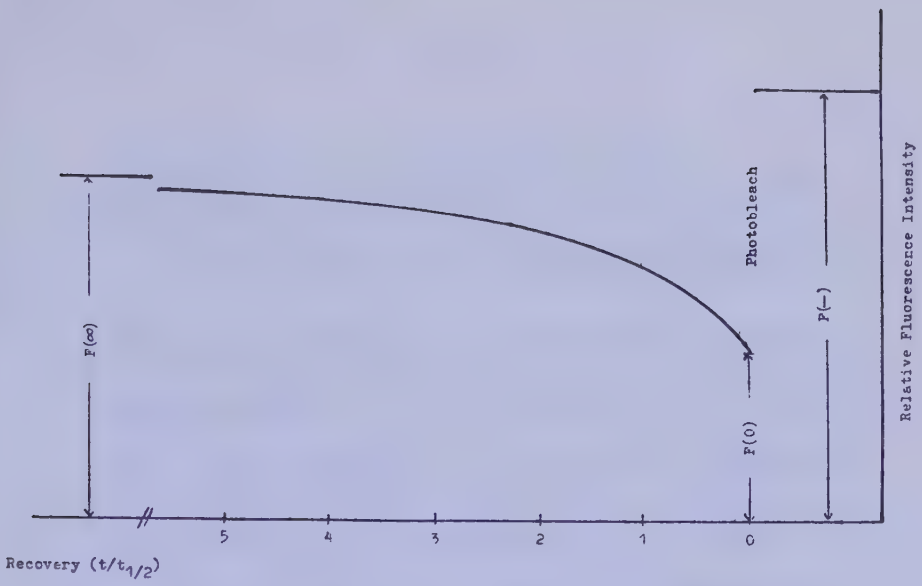

Abb. 6: Schematische Darstellung der Fluoreszenzrecovery-Kurve

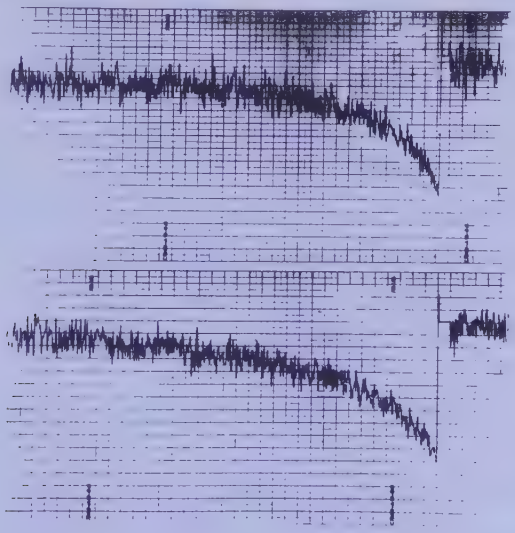

Abb 7: Originalmeßstreifen eines FRAP Experimentes.

Obere Kurve: $t_{1/2}$=16.5s ; untere Kurve: $t_{1/2}$=28.0s

$$D' = \gamma w^2 / 4\, t_{1/2}$$

wobei γ ein Parameter ist, der nur von dem Bleichgrad abhängt (hier $\gamma = 1.2$); w ist der $1/e^2$ Radius des Meßstrahles; $t_{1/2}$ ist die Halbwertszeit der Fluoreszenzrelaxation.

Die Fluorescence Recovery $f = (F_{(\infty)} - F_{(o)})/(F_{(-)} - F_{(o)})$ gibt den Bruchteil der frei diffundiblen Markermoleküle unter der vereinfachten Vorstellung, daß sich die Membransonden in 2 Klassen, frei bewegliche Moleküle mit gleichen Diffusionskoeffizienten und immobile Moleküle, aufteilen, an. Für f gilt : $f < 1$. Die genannte Formel zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wurde für die Diffusion in der Ebene abgeleitet. Da die Oberfläche der Hepatozyten infolge Mikrovillibildung gefaltet ist, wurde der Wert des Diffusionskoeffizienten D nach $D = 2 \times D'$ gemäß den Ergebnissen der Monte Carlo Simulationsrechnungen von Aizenbud et al. (51) festgelegt. Messungen von Proteindiffusionskoeffizienten dauern bei dem gewählten Bleichfleckdurchmesser ≥ 10 min. Um die Photolyse durch den Meßstrahl während dieser Zeit zu minimieren, wurde er nach kontinuierlicher Freigabe während der ersten 240 s nach dem Bleichen anschließend für 55 s alle 60 s geschlossen.

2.5 Versuchsplanung und statistische Auswertung

Für jede der drei Lipidsonden, F-C16, F-C12 und NBD-PC, sowie für FITC markierte Membranproteine wurde der Insulineffekt an vier Leberzellpräparationen bei Konzentration von 10^{-8} und 10^{-9} mol/l geprüft. Die vergleichenden Diffu-

sionsmessungen mit jedem der Farbstoffe wurden an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei Ratten des selben Wurfes verwendet wurden. Drei Ansätze - ohne Insulin, mit 10^{-8} und 10^{-9}mol/l Insulin - wurden parallel inkubiert. In der nachfolgenden Meßperiode wurden 2 Zellen von jedem der 3 Ansätze unterschiedlicher Insulin-Konzentration in zufälliger zeitlicher Reihenfolge gemessen. Danach wurde mit Zellen der Vorratssuspension eine neue Insulin-Inkubation begonnen. Pro Zellpräparation wurden so in jeder Behandlungsgruppe mindestens 8 Zellen gemessen. Aus vom Experimant unabhängigen Gründen konnte die Anzahl der gemessenen Zellen pro Leberzellpräparation um maximal $\pm$ 20 % schwanken.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse nach der Methode des ungewichteten Mittelwertes (52), wobei ein gemischtes Modell (Ratteneffekt fix, Behandlungseffekt zufällig) verwendet wurde. Die Verträglichkeit der Meßdaten jeder Zellpräparation-Behandlungsgruppe mit der Normalverteilung wurde mit dem Kolmogoroff Smirnoff Test (53) auf dem 15 % Niveau geprüft. Für jeden Farbstoff wurde die Homogenität der Varianzen aller zugehörigen Zellpräparations-Behandlungsgruppen mit dem Cochran Test auf dem 5 % Niveau überprüft (54).

Weiter wurden die Daten jeder Untergruppe auf Trend nach Edgington's Zeitreihen-Phasentest analysiert (55).

3 Resultate

3.1 Insulineffekt auf den lateralen Diffusionskoeffizienten und die Recovery der fluoreszenzmarkierten Lipide und Proteine

In den Tabellen 1-4 sind die Ergebnisse der Experimente zur Testung eines Insulineffektes auf den lateralen Diffusionskoeffizienten von Lipiden und unselektiv markierten Membranproteinen in der Plasmamembran lebender Rattenhepatozyten dargestellt. Der paarweise Vergleich des Diffusionskoeffizienten-Mittelwertes der Kontrollgruppe entweder mit dem der 10^{-9}-mol/l-Insulin- oder dem der 10^{-8}mol/l-Insulin-Behandlungsgruppe in der 2-fachen Varianzanalyse ergab für jede der getesteten Lipidsonden, NBD-PC, F-C16 und F-C12, einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Die Durchschnittsnullhypothese, Gleichheit der Diffusionskoeffizientenmittelwerte aller drei Behandlungsgruppen (kein Insulineffekt), ließ sich ebenfalls für alle Lipidsonden ablehnen ($p < 0,025$). Nach dem Satz von Marcus, Peritz und Gabriel (56) gelten daher die zwei Hypothesen, signifikanter Insulineffekt bei einer Konzentration von 10^{-9} und 10^{-8}mol/l, gleichzeitig ($p < 0,025$ für NBD-PC und F-C16 und $p < 0,05$ für F-C12).

Für keine Lipidsonde war ein Unterschied in den Diffusionskoeffizienten zwischen der 10^{-9} und 10^{-8}mol/l Insulinbehandlungsgruppe nachweisbar. Ebenso war in keinem der in den Tabellen 1-4 wiedergegebenen Experimenten ein Einfluß der verwendeten Rattenleberzellsuspension, jeweils von verschiedenen Tieren, auf dem 5 % Niveau signifikant.

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Meßfehler des Mittelwertes. Die gekennzeichneten Zellpräparationen stammen von jeweils verschiedenen Ratten. Zellzahl: gibt die Anzahl der gemessenen Zellen in jeder Behandlungsgruppe der jeweiligen Zellpräparation an; $\Delta D/D$: relative Abweichung des Diffusionskoeffizienten-Mittelwertes der Insulinbehandlungsgruppe von dem der Kontrollgruppe in % $((D_{Behandlung}-D_{Kontrolle}) / D_{Kontrolle})$; P_{H1}, P_{H2}, P_{H3}: p-Werte, die beim Testen der folgenden Hypothesen mittels Varianzanalyse erhalten wurden: H1 , Gleichheit der Mittelwerte in der Kontroll- und 10^{-9}mol/l Insulin-Gruppe; H2, Gleichheit der Mittelwerte in der Kontroll- und 10^{-8}mol/l Insulin-Gruppe; H3, Gleichheit des Mittelwertes der Kontrollgruppe mit dem der 10^{-9} mol/l und der 10^{-8}mol/l Insulinbehandlungsgruppe.

Tabelle 1

INSULINEFFEKT AUF DIE LATERALE DIFFUSION VON NBD-PC IN DER PLASMAMEMBRAN FRISCH ISOLIERTER RATTENHEPATOZYTEN

		Kontrolle	Insulin (10^{-9}mol/l)			Insulin (10^{-8}mol/l)			
Zell-präparation	Zell-zahl	D(x10^{9}) (cm^2/s)	D(x10^{9}) (cm^2/s)	Δ D/D (%)	p_{H1}	D(x10^{9}) (cm^2/s)	ΔD/D (%)	p_{H2}	p_{H3}
A	9	2.1±0.3	1.7±0.2	-19±15		1.4±0.1	-35±11		
B	9	2.4±0.3	1.9±0.3	-21±16		1.7±0.2	-31±11		
C	10	2.7±0.3	1.6±0.2	-41±10		1.8±0.2	-32+10		
D	9	2.7±0.4	1.8±0.4	-33±12		1.7±0.2	-37±11		
Total	37	2.5±0.2	1.7±0.1	-32± 7	0.02	1.6±0.1	-33± 5	0.004	0.0002
		Recovery (%)	Recovery (%)	Δ R/R (%)		Recovery (%)	ΔR/R (%)		
A	9	73±3	82±4	12±6		88±4	20±8		
B	9	79±3	87±4	10±6		85±5	8±8		
C	10	75±4	90±3	20±7		85±4	13±7		
D	9	77±5	79±4	2±8		79±4	2±5		
Total	37	76±2	85±2	11±4	0.049	84±2	11±4	>0.05	0.03

Tabelle 2

Probe: F-Cl6

Zell-präparation	Zell-zahl	Kontrolle D($\times 10^9$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-9}mol/l) D($\times 10^9$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-9}mol/l) ΔD/D (%)	p_{H1}	Insulin (10^{-8}mol/l) D($\times 10^9$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-8}mol/l) ΔD/D (%)	p_{H2}	p_{H3}
E	15	6.0±0.3	4.7±0.2	-21± 5		5.0±0.2	-17± 5		
F	10	6.7±0.5	4.6±0.3	-32± 9		5.8±0.2	-14±10		
G	12	5.0±0.4	3.9±0.4	-21±10		3.8±0.4	-24±10		
H	10	3.7±0.3	3.3±0.3	-12±10		3.1±0.3	-18± 3		
Total	47	5.4±0.2	4.1±0.2	-22± 4	0.04	4.4±0.2	-18± 4	0.003	0.01

		Recovery (%)	Recovery (%)	ΔR/R (%)		Recovery (%)	ΔR/R (%)		
E	15	70±3	74±3	6±6		76±3	8±5		
F	10	77±4	75±4	-2±7		76±5	-2±8		
G	12	79±4	81±2	2±6		86±3	10±7		
H	10	81±3	86±3	5±6		88±4	9±6		
Total	47	77±2	79±2	3±3	>0.05	82±2	6±3	>0.05	>0.05

Tabelle 3

Prabe: F-Cl2

Zell-präparation	Zell-zahl	Kontrolle D($\times 10^9$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-9}mol/l) D($\times 10^9$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-9}mol/l) $\Delta D/D$ (%)	p_{H1}	Insulin (10^{-8}mol/l) D($\times 10^9$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-8}mol/l) $\Delta D/D$ (%)	p_{H2}	p_{H3}
I	10	18±1	16±2	-14±10		15±1	-19± 7		
J	12	18±1	16±2	-13±10		15±1	-14± 5		
K	12	19±1	16±1	-17±10		16±1	-16± 7		
L	10	20±2	15±1	-28± 8		17±1	-17±11		
Total	44	19±1	15±1	-18± 5	0.02	16±1	-17± 4	0.001	0.003

		Recovery (%)	Recovery (%)	$\Delta R/R$ (%)		Recovery (%)	$\Delta R/R$ (%)		
I	10	70±5	69±4	-2±8		67±5	-5±9		
J	12	65±3	68±2	5±6		73±5	12±9		
K	12	63±3	63±4	2±7		63±2	-1±5		
L	10	71±3	68±3	4±6		71±3	0±7		
Total	44	67±2	67±2	0±4	>0.05	68±2	2±4	>0.05	>0.05

Tabelle 4

Probe: FITC

Zell-präparation	Zell-zahl	Kontrolle D($\times 10^{10}$) (cm^2/s)	Insulin (10^{-9} mol/l) D($\times 10^{10}$) (cm^2/s)	$\Delta D/D$ (%)	p_{H1}
M	10	8.6±1.4	8.8±1.2	2±24	
N	10	5.9±1.0	6.8±0.8	15±24	
O	10	6.5±0.7	7.1±1.1	9±21	
P	8	4.4±0.6	4.8±0.7	9±21	
Total	38	6.5±0.5	6.9±0.5	8±10	0.054
		Recovery (%)	Recovery (%)	$\Delta R/R$ (%)	
M	10	74±5	59±6	-20±10	
N	10	74±6	74±6	0±11	
O	10	63±9	67±7	6±19	
P	8	75±8	65±7	-13±13	
Total	38	71±4	66±3	-7±7	>0.05

Tabelle 5

Probe: NBD-PC

KONTROLLMESSUNGEN ZUR SPEZIFITÄT UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES INSULINEFFEKTES

Behandlung	Zahl der Zellpräp.	Zell-zahl	$\Delta D/D$ (%)	p_{H4}	$\Delta R/R$ (%)	p_{H4}
Insulin 10^{-10}	3	27	6±11	>0.05	-4±7	>0.05
Proinsulin 10^{-9}	2	18	11± 9	>0.05	0±6	>0.05
Proinsulin 10^{-8}	2	18	8± 9	>0.05	2±7	>0.05
Desinsulin 10^{-9}	2	18	-6±13	>0.05	3±5	>0.05
Desinsulin 10^{-8}	2	18	-5±13	>0.05	5±5	>0.05

Desinsulin: Desoctapeptid-insulin; Zahl der Zellpräp.: Anzahl der verwendeten Zellpräparationen von verschiedenen Ratten, um den Insulineffekt zu testen; p_{H4} , p-Wert, der beim Testen der Hypothese - Gleichheit der Mittelwerte in der Kontroll- und assoziierten Behandlungsgruppe - mittels Varianzanalyse erhalten wurde.

Tabelle 6

Probe: F-C16

Behandlung	Zahl der Zellpräp.	Zell-zahl	ΔD/D (%)	p_{H4}	Δ R/R (%)	p_{H4}
Insulin 10^{-11}	3	28	3±15	>0.05	2±3	>0.05
Insulin 10^{-10}	5	46	-10± 7	>0.05	1±3	>0.05
Proinsulin 10^{-8}	2	22	8±12	>0.05	-11±5	>0.05
Desinsulin 10^{-8}	2	22	9±12	>0.05	-6±6	>0.05

Tabelle 7

Probe: F-C12

Behandlung	Zahl der Zellpräp.	Zell-zahl	$\Delta D/D$ (%)	p_{H4}	$\Delta R/R$ (%)	p_{H4}
Insulin 10^{-10}	3	35	-1 ± 7	>0.05	-7 ± 4	>0.05
Proinsulin 10^{-8}	2	22	4 ± 8	>0.05	-3 ± 4	>0.05
Desinsulin 10^{-8}	2	23	9 ± 9	>0.05	-10 ± 4	>0.05

Bei jeder der in den Tabellen 1-7 wiedergegebenen Untersuchungen waren die Voraussetzungen der Varianzanalyse, Homogenität der Varianzen und Normalverteilung der Daten in den Zellpräparations-Behandlungsgruppen, erfüllt. In keiner dieser Untergruppen war ein Einfluß des Alters der Zellsuspension bis zur Messung, also ein Trend, nachweisbar. Eine Formanalyse der Fluorescence-Recovery-Meßkurven zeigte nie einen Wendepunkt, so daß reine Diffusionsvorgänge und kein gerichteter Fluß gemessen wurden (49). Mit Ausnahme eines signifikanten 10^{-9}mol/l Insulineffektes auf die Recovery von NBD-PC in markierten Hepatozyten war kein genereller Einfluß von Insulin auf die Fluorescence Recovery nachweisbar. Insbesondere wurde für keine der Proben eine signifikante Korrelation zwischen dem Diffusionskoeffizienten und der Recovery gefunden. Eine solche könnte ein Hinweis auf Anfärbung des Zytoskeletts oder großer intrazytoplasmatischer Organellen sein (57).

Aus den Tabellen 5-7 ist zu ersehen, daß Insulin in Konzentrationen $\leq 10^{-10}$mol/l keinen Einfluß auf den Diffusionskoeffizienten der Lipidsonden mehr hat. Im Gegensatz zu den Lipidsonden wurde die Mobilität der durch FITC markierten Membranproteine in jeder Zellpräparation durch 10^{-9}mol/l Insulin vergrößert. Dieses Ergebnis war jedoch in der Varianzanalyse nicht signifikant ($p = 0{,}054$).

3.2 Die Spezifität des Insulineffektes

wurde durch Kontrollmessungen mit Insulinanalogen von nur sehr geringer biologischer Aktivität, Desoctapeptidinsulin und Proinsulin, untersucht. Beide Analoge zeigten in einer

Konzentration von 10^{-8}mol/l keinen signifikanten Einfluß auf die laterale Mobilität von NBD-PC, F-C16 und F-C12 (Tabelle 5-7). Die Hypothese, daß Insulinanaloge eine Verkleinerung des Diffusionskoeffizienten um 20 % bewirken, konnte für Proinsulin und alle verwendeten Lipidproben verworfen werden ($p < 0,05$, Varianzanalyse). Für den Desoctapeptidinsulineffekt auf die F-C16 - und F-C12 - Diffusion konnte diese Hypothese ebenfalls verworfen werden.

3.3 Um die Zeitabhängigkeit des Insulineffektes auf die laterale Diffusion zu überprüfen, wurden Hepatozyten nach der Markierung mit NBD-PC 7 Minuten bei Raumtemperatur in MEM-D, 0,3 % BSA, 10^{-9}mol/l Insulin, inkubiert. Sofort anschließend wurde die Diffusionsmessung durchgeführt. In diesem Experiment war eine signifikante Abnahme der Mobilität von NBD-PC nachweisbar. ($\Delta D/D = -32 \pm 8$ %, $p < 0,05$, t-test). Hierbei wurden jeweils 12 Zellen derselben Hepatozytenpräparation in der Kontroll- und Insulin-Behandlungsgruppe gemessen. NBD-PC hatte die geringste Penetrationsgeschwindigkeit in das Zytoplasma bei Raumtemperatur und wurde daher für diese Untersuchung gewählt. Kürzere Insulin-Inkubationszeiten als 7 min wurden nicht gewählt, da die zeitliche Auflösung der FRAP-Messung (die Recoverymessung für Lipidsonden dauert ca. 4 min) begrenzt ist.

3.4 Temperaturabhängigkeit des Insulineffektes

Der Insulineffekt auf die Lipiddiffusion wurde ebenfalls bei 37°C getestet. Für Diffusionsmessungen mit NBD-PC oder

F-C16 wurden jeweils 12 Zellen mit 10^{-9}mol/l Insulin oder ohne Insulin 25 min bei 37°C inkubiert, bei 4° C dann fluoreszenzmarkiert und bis zur Messung, die bei 37°C ausgeführt wurde, gelagert. Das Resultat für NBD-PC war: $D=3.5 \pm 0.4 \times 10^{-9} cm^2/s$ (Mittelwert der Kontrollgruppe); $\Delta D/D = -26 \pm 9$ %, $p < 0.05$ (t-test). Für F-C16 wurde gefunden : $D = 7.8 \pm 0.3 \times 10^{-9}$ cm^2/s; $\Delta D/D = -22 \pm 8$ %, $p < 0.05$ (t-test). Der Insulineffekt war also bei beiden Temperaturen, 22°C und 37°C, gleichgroß. Auch bei 37°C war kein Hormon-Einfluß auf die Recovery nachweisbar.

3.5 Die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von NBD-PC und F-C16

wurde in gesonderten Messungen bestimmt (Tabelle 8).

Probe	D(10°C) ($10^{-9}cm^2/s$)	D(21°C) ($10^{-9}cm^2/s$)	D(37°C) ($10^{-9}cm^2/s$)	E_a (Kcal/mol)
NBD-PC	1.7±0.2	2.9±0.3	3.4±0.3	4.3
F-C16	3.2±0.4	5.3±0.5	8.0±0.5	5.9

Tabelle 8 : Temperaturabhängigkeit des lateralen Diffusionskoeffizienten ; E_a: Diffusionsaktivierungsenergie; die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils 10 Messungen angegeben.

Der Anstieg des Diffusionskoeffizienten mit der Temperatur ist durch Veränderungen der Molekulardynamik der umgebenden Lipidphase und möglicherweise durch Veränderung der Farbstoffverteilung auf die einzelnen Membrandomänen bedingt (58).

Die Aktivierungsenergie, die aus der Regressionsgeraden an die Temperatur-Diffusionskoeffizientendaten in Arrhenius-Darstellung gewonnen wurde, stimmt gut mit den Diffusionsaktivierungsenergien von verschiedenen Lipidsonden in Flüssigphase-Lipidbilayern und in Plasmamembranen von Kückenmyobuben überein (58,59). In dem betrachteten Temperaturbereich waren keine größeren Diffusionsänderungen, wie sie bei einem, die Umgebung aller in die Membran integrierten Farbstoffmoleküle betreffenden Phasenübergang typisch sind, nachweisbar.

4 Diskussion

In dieser Untersuchung ist gezeigt worden, daß Insulin in einer Konzentration von 10^{-9} und 10^{-8} mol/l gleichförmig die lateralen Diffusionskoeffizienten dreier amphipatischer Lipidsonden, NBD-PC, F-C16, F-C12 reduziert.

4.1 Lateraler Diffusionskoeffizient und Membranorganisation

Die verwendeten Sonden unterscheiden sich in ihrer Struktur oder haben unterschiedliche Längen ihrer Fettsäure-Acylketten. Die Fluorescein-Gruppe der Fettsäure-Analoga F-C12 und F-C16 bleibt im polaren Bereich der Doppelmembran, dem Bereich der hydrophilen Kopfgruppen; die Fettsäure-Acylketten orientieren sich zum Membraninneren. Die fluoreszierende Gruppe von NBD-PC liegt hingegen im Membraninneren (59,60). Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß sich die absoluten Diffusionskoeffizienten der verwendeten Lipidsonden deutlich unterscheiden und nicht, wie in Flüssigphase-Multilayern oder einphasigen Liposomen, unabhängig von der Struktur oder Acylkettenlänge des Chromophores sind (59,61,62). Gründe hierfür liegen in der Membranheterogenität und den unterschiedlichen Eigenschaften der Sonden, sich in die heterogene Lipidmatrix einzupassen.

Die Mikroheterogenität der lateralen Lipidorganisation in den Zellmembranen kann durch Lipid-Lipid (63,64,65,66) oder Lipid-Protein Wechselwirkungen (13,63,67) bedingt sein. Proteine können je nach Konformation und Ladung in

radialer Richtung ca 10^1 benachbarte Lipide ordnen (68). Der Gehalt an Membranproteinen z.B. in Caps oder Patches, deren Bildung durch Antikörper-Antigen-oder Ligand-Rezeptorbindung induziert wird, kann sich über µm-Distanzen ändern. Über die Protein-Lipid Wechselwirkung sind daher auch Änderungen in der Lipidzusammensetzung über ähnliche Distanzen möglich. Zwischen der inneren und äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht bestehen ebenfalls Unterschiede in der Lipidzusammensetzung (64,69).

Der gemessene makroskopische Diffusionskoeffizient einer Lipidsonde über Distanzen im µm-Bereich ist eine Funktion der Verteilungskoeffizienten der Probe in die verschiedenen Lipiddomänen, der Diffusionskoeffizienten innerhalb der Domänen und der topologischen Verteilung dieser Regionen.

Eine ähnliche Abhängigkeit des lateralen Diffusionskoeffizienten von der Acylkettenlänge, wie sie hier für Fluorescein-Fettsäurekonjugate (F-Cn's) gefunden wurde, konnte für diI-Cn's in Multilayern aus Lipidgemischen im Temperaturbereich der Phasenseparation demonstriert werden (61). Die wahrscheinlichste Interpretation hierfür ist eine bevorzugte Integration von Lipidsonden mit kürzeren Acylketten als die der Membranphospholipide im Multilayer in die Flüssigphase-Gebiete. Sonden mit längeren Ketten als die der Wirtslipide integrieren sich hauptsächlich in die Gelphase-Bezirke.

Die hier gemessenen absoluten Diffusionskoeffizienten von NBD-PC stimmen gut mit den für den gleichen Farbstoff in Plasmamembranen von V79 Hamsterfibroblasten festgestellten

Werten überein (33).

Die für FITC-markierte Proteine in den Hepatozyten ermittelten Diffusionskoeffizienten stimmen ebenfalls gut mit Literaturangaben für die Proteindiffusion in anderen Zelltypen überein (70).

Die Fluoreszenzrecovery aller Farbstoffe hat im Bereich von 65-85 % gelegen und ist somit unvollständig gewesen. Dies deutet auf eine Integration von Fluoreszenzsonden bei der Färbung in Membrangebiete hin, die kein Eindringen der Proben aus ungebleichten Arealen durch laterale Diffusion während der Meßzeit erlauben.

4.2 Insulineffekt auf die Membrandynamik

Insulin vermindert gleichsinnig die laterale Mobilität von drei Lipidsonden mit unterschiedlicher Struktur oder Acylkettenlänge und mit unterschiedlichen absoluten Diffusionskoeffizienten. Dies zeigt eine Veränderung der Dynamik und damit der Struktur einer Vielzahl von Lipiddomänen durch das Hormon an.

Unter der Voraussetzung, daß die Hepatozytenmembranorganisation nicht durch die FITC-Markierung beeinflußt wird, konnte gezeigt werden, daß die Mobilität eines breiten Querschnittes von Membranproteinen, hauptsächlich integrale Proteine (31,38), durch Insulin nicht signifikant verändert wird. Insulininduzierte Veränderungen der Lipiddynamik gehen nicht mit gleichgerichteten Veränderungen der Proteindynamik einher. Diese Unterschiede deuten darauf hin, daß die laterale Diffusion von Proteinen hauptsächlich durch Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett oder peripheren Mem-

branproteinen an der inneren und äußeren Membranoberfläche bestimmt wird. Die Bedeutung dieser Wechselwirkungen ist auch durch andere Photobleaching-Studien herausgestellt worden (71,39). Wegen der Vielzahl FITC markierter Membranproteine mag jedoch ein Insulineffekt auf einzelne Membranproteinklassen unentdeckt bleiben.

Als Mechanismen, über die Insulin die Lipiddynamik beeinflussen kann, kommen in Frage:
Veränderungen des molaren Verhältnisses von Phospholipiden und Cholesterol (57,62,65), Verlängerung der Acylketten oder Erhöhung des Anteiles ungesättigter Fettsäuren durch membranständige Enzyme (65,72), Veränderung des Umsatzes und der Konzentration einzelner Phospholipidklassen in der Membran (28,73,9,74), Methylierung von Phospholipiden durch membranständige Enzyme (75), Modulation des membrangebundenen Calciums (23,76), Vermehrung der Anzahl intramembranärer Proteine (77), oder direkte Veränderung der Lipidorganisation durch Konformations- oder Strukturänderung oder Aggregation der Insulinrezeptoren (15,78,79,92). So haben z.B. Farese et al. (9) gezeigt, daß Insulin innerhalb von 15 min die Konzentration von Inositollipiden und Phosphatidsäure im Fettgewebe und isolierten Adipozyten erhöht. Ein bedeutender Anteil des Inositollipidstoffwechsels befindet sich in der Plasmamembran, was die Bedeutung dieser Lipide in der Membran unterstreicht. Die anionischen Inositollipide sind als Fluiditätssenker bekannt (65) und binden Calcium. McDonald et al. (76) haben gezeigt, daß Plasmamembranen insulinvorbehandelter Zellen vermehrt Calcium binden. Calcium für sich senkt jedoch ebenfalls die Membranfluidität (80).

Als mögliche Gründe der Unterschiede in den Ergebnissen bisher durchgeführter Untersuchungen über den Einfluß von Insulin auf die Membranlipiddynamik sind zu nennen:

A) Mangelnde Korrelation zwischen Lateral- und Rotationsdiffusion in einem hoch anisotropen Medium wie der Plasmamembran. Diffusionsvorgänge in Plasmamembranen können durch modifizierte Theorien über Diffusion in Polymeren beschrieben werden (81,82). Kleinfeld et al. (83) zeigten z.B., daß in Lymphozytenmembranen nach der Inkubation mit Linolsäure keine Korrelation zwischen der Veränderung der Membranfluidität, gemessen mit der DPH-Fluoreszenzdepolarisationstechnik und der lateralen Mobilität von diI-C18 (3), gemessen mit FRAP, besteht.

B) Unterschiedliche Zeitskalen der verwendeten physikalischen Meßmethoden. Die Elektronenspinresonanzspektroskopie z.B. ist nur empfindlich für Bewegungsvorgänge mit einer Korrelationszeit von 10^{-7}s.

C) Der Insulineffekt mag von der zellulären Integrität und damit von zytoplasmatischen Faktoren abhängig sein. So ist bekannt, daß Plasmamembranvesikel von Fett- oder Muskelzellen nur dann einen verstärkten Glucosetransport zeigen, wenn das Hormon vor der Zellhomogenisierung hinzugefügt wurde (2,84,85).

D) Unterschiedliche Wechselwirkungen der verwendeten Sonde mit der Membran.

E) Unterschiedliche Zellen mögen verschiedenartig reagieren.

4.3 Bedeutung der veränderten Lipiddynamik für den Insulinwirkungsmechanismus

Die meisten, wenn nicht alle Insulineffekte auf zellulärer Ebene werden durch die Hormon-Rezeptorbindung initiiert.

Verzweigungen der danach ablaufenden Reaktionskette sind aber notwendige Voraussetzung für die Vielzahl der physiologischen Insulineffekte. An früher Stelle kann durch die Modulation der Membranstruktur, die wechselseitig mit veränderter Lipiddynamik einhergeht, eine wichtige Verzweigung in der Insulinwirkungskette bedingt werden. Durch Veränderung der Lipiddynamik können viele Transportvorgänge und membrangebundene Enzyme selektiv beeinflußt werden (13,86,87,88).

Beobachtungen von Yuli et al. (88) unterstreichen die biologische Bedeutung der Membranfluiditätsmodulation. Es ist gezeigt worden, daß ein 30 %iger Anstieg der Lipidmikroviskosität (gemessen mittels DPH-Depolarisation), der durch Inkubation der Zellen mit Cholesterylhemisuccinat bedingt worden war, insulinähnliche Wirkungen hat, wie ein Anstieg der 2-Deoxyglucose-oder α-Aminobuttersäure-Transportrate durch die Membran. Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Adipozytenplasmamembran durch Inkubation mit Fettsäuren oder Lipiden können auch spezifisch zu veränderten Glucosetransportraten führen (89,90).

Zusammenfassend vermindert Insulin den lateralen Diffusionskoeffizienten dreier Lipidsonden in der Plasmamembran lebender, isolierter Hepatozyten. Diese Veränderung kann eine Vielzahl membrangebundener Prozesse beeinflussen. Die einzelnen molekularen Schritte von der Hormon-Rezeptorbindung bis zur Veränderung der Lipiddynamik erfordern weitere Aufklärung mit anderen Methoden.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Stuschke, M., Bojar, H. Insulin effect on translational diffusion of lipids and proteins in the plasma membrane of isolated rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta 845: 436-444, 1985.

Zusammenfassung

Die Effekte von Insulin auf die laterale Diffusion von Lipiden und Proteinen in der Plasmamembran intakter Rattenhepatozyten wurden mit der Fluorescence Photobleaching Methode, die auf der Messung der Fluoreszenzredistribution in der Zellmembran nach dem Bleichen einer diskreten Membranregion mittels fokussiertem Laserlicht beruht, untersucht.

Als Lipidsonden wurden die amphiphilen Fluorophore 1-Acyl-2-(N-4 nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl)-aminocaproyl phosphatidylcholin (NBD-PC), 5-(N-Hexadecanoyl) aminofluorescein (F-C16), 5-(N-Dodecanoyl) aminofluorescein (F-C12) und zur Membranproteinmarkierung Fluorescein isothiocyanat verwandt. Die Mittelwerte der lateralen Diffusionskoeffizienten von NBD-PC, F-C16 und F-C12 betrugen $2.5 \cdot 10^{-9} cm^2/s$, $5.4 \cdot 10^{-9} cm^2/s$ und $19 \cdot 10^{-9} cm^2/s$ bei einer Meßtemperatur von 21^oC. Insulin reduzierte in einer Konzentration von 10^{-9} und $10^{-8} mol/l$ den Diffusionskoeffizienten von F-C16 und F-C12 in der Hepatozytenmembran um 20% und von NBD-PC um 30%. Dieser Effekt war bei 21^o und 37^oC nachweisbar und setzte innerhalb von 7min ein. Unter gleichen Bedingungen war bei $10^{-10} mol/l$ Insulin kein Effekt auf die Lipidmobilität mehr nachweisbar. Kontrollinkubationen mit Proinsulin und Desoctapeptid insulin ($10^{-8} mol/l$) zeigten keinen signifikanten Effekt, was die Spezifität des Insulineffektes bestätigt.

Im Gegensatz zu der Lipiddiffusion wurde die laterale Mobilität der durch Fluorescein isothiocyanat markierten Membranproteinfraktion nicht durch Insulin beeinflußt.

Durch die Verringerung der Lipidmobilität in der Plasmamembran intakter Zellen können eine Vielzahl membrangebundener Prozesse beinflußt werden und so kann die hier beobachtete Modulation der Membrandynamik ein bedeutendes Glied im Insulinwirkungsmechanismus sein.

genehmigt:

6 Literaturangaben

1 Kahn,C.R.,Baird,L.K.,Flier,J.S.,Grunfeld,C.,Harmon, J.T.(1983)Recent Prog.Horm.Res.37,477-538

2 Czech,M.P.(1977)Ann.Rev.Biochem.46,359-384

3 Levine,R.(1982)Vitamines and Hormones39,145-173

4 Larner,J.(1983)The American Journal of Medicine 74No 1A,38-51

5 Seals,J.R.,Czech,M.P.(1982)Fed.Proc.41,2730-2735

6 Goldfine,J.D.(1977)Diabetes 26,148-152

7 Jacobs,S.,Cuatrecasas,P.(1983)Ann.Rev.Pharmacol. Toxicol.23,461-79

8 Seals,J.R.,Mc Donald,J.M.,Jarett,L.(1979)J.Biol.Chem. 254,6991-6996

9 Farese,R.V.,Larson,R.E.,Sabir,M.A.(1982)J.Biol.Chem. 257,4042-4045

10 Jarett,L.,Küchle,F.L.,Parker,J.C.,Macaulay S.L.(1983) The American Journal of Medicine 74 No1A,31-37

11 Macaulay ,S.L.,Kiechle,F.L.,Jarett,L.(1983)Biochim. Biophys.Acta760,293-299

12 Mc Millan,D.E.(1983)Diabetologia 24,308-310

13 Sandermann,H.(1978)Biochim.Biophys.Acta 515,209-237

14 Schroeder,F.(1982)J.Membr.Biol.68,1-10

15 Luly,P.,Shinitzky,M.(1979) Biochemistry 18,445-450

16 Luly,P.,Baldini,P.,Incerpi,S.,Tria,E.(1981)Experentia 37,431-432

17 Shinitzky,M.,Yuli,I.(1982)Chem.Phys.Lipids 30,261-282

18 Bailey,I.A.,Garrat,C.J.,Wallace,S.M.(1978)Biochem. Soc.Trans.6,302-4

19 Luly,P.,Crifo,C.,Storm,R.(1979)Experentia 35,1300-1301

20 Bryszewska,M.,Leyko,W.(1983)Diabetologia 24,311-313

21 Schreier,S.,Ponaszek,C.F.,Smith,F.C.(1978)Biochim.

Biophys.Acta 515,375-436

22 Amatruda,J.M.,Finch,E.D.(1979)J.Biol.Chem.254,2619-2625

23 Sauerheber,R.D.,Lewis,U.J.,Esgate,J.A.,Gordon,L.M. (1980)Biochim.Biophys.Acta 597,292-304

24 Kamada,T.,Otsuji,S.(1983)Diabetes 32,585-591

25 Massa,E.M.,Morero,R.D.,Bloj,B.,Farias,R.(1975)Biochem. Biophys.Res.Commun.66,115-122

26 Bojar,H.,Balzer,K.Reiners,K.,Basler,M.,Reipen,W., Staib,W.(1975):Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.13,25-30

27 Terris,S.,Steiner,D.F.(1975)J.Biol.Chem.250,8389-8398

28 Stein,J.M.,Hals,L.N.(1974)Biochim.Biophys.Acta 337,41-49

29 Wolf,D.E.,Edidin,M.,Handyside,A.H.(1981)Dev.Biol.85, 195-198

30 Wolf,D.E.,Kinsey,W.,Lennarz,W.,Edidin,M.(1981)Dev. Biol.81,133-138

31 Edidin,M.,Zagyansky,Y.,Lardner,T.J.(1976),Science 191, 466-468

32 Peters,R.,Peters,J.,Tews,K.H.,Bähr,W.(1974) Biochim.Biophys.Acta 367,282-294

33 Struck,D.K.,Pagno,R.E.(1980)J.Biol.Chem.255,5404-5410

34 Gaffney,B.J.,McConnell,H.M.(1974)J .Magn.Res.16,1-28

35 Brulet ,P.,McConnell,H.M.(1975)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72 ,1451-1455

36 Seelig,J.(1978)Biochim.Biophys.Acta 515,105-141

37 Galla,H.J.,Sackmann,E.J.(1974)Biochim.Biophys.Acta 339,103-115

38 Fowler,V.,Branton,D.(1977)Nature 268,23-26

39 Schindler,M.,Koppel,D.D.,Sheetz,M.P.(1980)Proc.Natl. Acad.Sci.USA 77,1457-1461

40 Edidin,M.,Fambrough,D.(1973)J.Cell Biol.57,27-53

41 Poo,M.M.,Lam,J.W.,Orida,N.,Chao,A.W.(1979)Biophys.J. 26,1-22

42 Poo,M.M.,Cone,R.A.(1974)Nature 247,438-441

43 Smith,B.A.,Mc Connell,H.M.(1978)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75,2759-2763

44 Koppel,D.E.,Axelrod,D.,Schlessinger,J.,Elson,E.L., Webb,W.W.(1976)Biophys.J.16,1315-1329

45 Taylor,R.B.,Duffus,P.H.,Raff,M.C,de Petris,S.(1971) Nat.New.Biol 233,225-229

46 Karnovsky,M.,Unanue,E.R.,Leventhal,M.(1972)J.Exp. Med. 136,907-929

47 Axelrod,D.,Ravdin,P.,Koppel,D.E.(1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73,4594-4598

48 Dragsten,Pl,Henkart,P.(1979)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76,5163-5167

49 Axelrod,D.,Koppel,D.E.Schlessinger,J.,Elson,E.,Webb,W. (1976)Biophys.J.16,1055-67

50 Sheets,M.P.,Koppel,D.E.(1979)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76,3314-3317

51 Aizenbud,B.M.,Gershon,N.D.(1982)Biophys.J. 38,287-293

52 Searle,S.R.(1971) Linear Models,Wiley,N.Y.

53 Lilliefors,H.W.(1967)J.Amer.Statist.Assoc.62,399-402

54 Eisenhart,C.,Hastay,M.W.,Wallis,W.A.(1947)Techniques of Statistical Anlysis,Mc Graw-Hill,New York

55 Edgington,E.S.(1961)J.Am.Stat. Ass.56,156-159

56 Marcus,R.,Peritz,E.,Gabriel,K.R.(1976)Biometrica 63, 655-660

57 Searls,D.B.,Edidin,M.(1981)Cell 24,511-517

58 Axelrod,D.,Wight,A.,Webb,W.,Hrwitz,A.(1978)Biochemistry 17,3604-3609

59 Derzko,Z.,Jacobson,K.(1980)Biochemistry 19,6050-6057

60 Yguerabide,J.,Forster,M.C.(1981)in membrane spectroscopy (Grell,E. eds)pp.211-214 Springer Verlag,Berlin,Heidelberg,New York

61 Klausner,R.D.,Wolf,D.E.(1980)Biochemistry 19,6199-6203

62 Alecio,M.R.,Golan,D.E.,Veach,W.R.,Rando,R.R.(1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,5171-5174

63 Nicolson,G.L.(1976)Biochim.Biophys.Acta 457,57-108

64 Linden,L.D.,Wright,K.L.,Mc Connell,H.M.,Fox,L.F.(1973) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70,2271-2275

65 Shinitzky,M.,Henkart,P.(1979)Int.Rev.Cytol.60,121-144

66 Grant,C.W.,Wu,S.H-W.,Mc Connell,H.W.(1974)Biochim. Biophys.Acta 363,151-158

67 Chapman,D.,Gomez-Fernandez,J.C.,Goni,F.M.(1979)FEBS Letters 98,211-222

68 Jähning ,F.(1981)Biophys.J.36,347-357

69 Bergelson,L.D.,Barsukov,L.I.(1977)Science 197,224-230

70 Peters,R.(1981)Cell Biology International Reports 5, 733-760

71 De Laat,S.W.,van der Saag,P.T.,Elson,E.L.,Schlessinger, J.(1980)Proc.Natl.Acad.USA,77,1526-1528

72 Clejan,S.,Collipp,P.J.,Maddaiah,V.I.(1980)Arch.Biochem. Biophys.203,744-752

73 Torrontegui,G.,Berthet,J.(1966)Biochim.Biophys.Acta 116,477-481

74 Michell,R.H.(1975)Biochim.Biophys.Acta 415,81-147

75 Hirta,F.,Strittmatter,W.J.,Axelrod,J.(1979)Proc.Natl. Acad.Sci.USA 76,368-372

76 Mc Donald,J.B.,Bruns,D.E.,Jarrett,L.(1976)Proc.Natl. Acad.Sci.USA 73,1542-1546

77 Carpentier,J.L.,Perrelet,A.,Orci,L.(1976)J.Lipid Res.17,335-342

78 Singer,S.J.,Nicolson,G.L.(1972)Science 175,720-730

79 Cuatrecasas,P.(1973)Fed.Proc.32,1838-1846

80 Livingstone,C.J.,Schachter,D.(1980)Biochemistry 19, 4823-4827

81 Pace,R.J.,Chan,S.I.(1982)J.Chem.Phys. 76,4241-4247

82 Schindler,M.,Osborn,M.J.,Koppel,D.E.(1980)Nature 283, 346-350

83 Kleinfeld,A.M.,Dragsten,P.,Klausner,R.D.,Pjura,W.J., Matayoshi,E.D.(1981)Biochim.Biophys.Acta 649,471-480

84 Avurch,J.,Carter,J.R.,Martin,D.B.(1972)Biochim.Biophys. Acta 288,27-42

85 Wardzala,C.J.,Jeanrenaud,B.(1981)J.Biol.Chem. 256, 7090-7093

86 Farias,R.N.,Bloj,B.,Morero,R.D.,Sineriz,F.Trucco,R.E. (1975)Biochim.Biophys.Acta 415,231-251

87 Fourcans,B.,Jain,M.K.(1974)Adv.Lipid Res.12,147-226

88 Yuli,I.,Incerpi,S.,Luly,P.,Shinitzky,M.(1982)Experentia 38, 1114-1115

89 Pilch,P.F.,Thomson,P.A.,Czech,M.P.(1980)Proc.Natl.Acad. USA 77.915-918

90 Sandra,A.,Fyler,D.J.(1981)Am.J.Physiol. 241,E 281-E 290

91 Gregorescu,F.,White,M.F.,Kahn,R.C.(1983)J.Biol.Chem. 258,13708-13716

92 Grunberger,G.,Zick,Y.,Gorden,P.(1984)Science223,932-934

93 Misbin,R.I.,Almira,E.C.(1984)Diabetes33,335-361

Herrn Professor Dr. med. H. Bojar danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

L e b e n s l a u f

Name:	Martin Carolus Stuschke
Geburtsdatum:	21.2.1959
Geburtsort:	Düsseldorf
Wohnung:	4040 Neuss 1, Koenenstr.11
Eltern:	Alfred Stuschke
	geb.: 24.6.23, Dipl. Ing.
	Christiane Stuschke geb. Steiner
	geb.: 16.4.29
Bildungsweg:	
1965-1968	Grundschule St. Konrad, Neuss
1968-1977	Quirinus-Gymnasium Neuss, Abitur
WS 77/78 - SS 80	Doppelstudium Medizin/Physik, Universität
	Düsseldorf, Vordiplom Physik
WS 80/81 - SS 81	Auslandsstudium Medizin, Universität
	Wien
WS 81/82 - DD 83	Medizinstudium, Universität Düsseldorf
29.11.1983	Ärztliche Prüfung
Seit 12.1983	Wissenschaftlicher Assistent in der
	Universitätsstrahlenklinik Essen.

Neuss, den 1.10.1984

M Stuschke